

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 5 月 8 日 (08.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/038430 A1

(51) 国際特許分類: **G01N 33/50**,
33/15, A61K 45/00, A61P 29/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/11147

(22) 国際出願日: 2002 年 10 月 28 日 (28.10.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-330835
2001 年 10 月 29 日 (29.10.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水島 徹

(MIZUSHIMA, Tohru) [JP/JP]; 〒700-0931 岡山県 岡
山市 奥田西町 9 番 1 1 号 2 O 2 Okayama (JP). 成尾
憲一 (NARUO, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒669-1535 兵庫県 三
田市 南が丘 1 丁目 1 番 2 号 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目
1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許

[続葉有]

(54) Title: SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: スクリーニング方法

(57) Abstract: (1) A method of screening a compound having a COX inhibitory effect and a weak effect of inducing necrosis and/or apoptosis, characterized by comprising culturing digestive mucosal cells in the presence of a compound having a COX inhibitory effect and detecting the activity of inducing necrosis and/or apoptosis; (2) a method of screening a compound having a COX inhibitory effect and an effect of inhibiting the induction of necrosis and/or apoptosis, characterized by comprising culturing digestive mucosal cells in the presence of a compound having a COX inhibitory effect and a necrosis inducer or an apoptosis inducer, and detecting the activity of inducing necrosis and/or apoptosis; and (3) a compound, its salt, etc. obtained by the screening method (1) or (2).

(57) 要約:

①COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法、②COX阻害作用を有する化合物およびネクロシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法および③上記①または②のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩などを提供する。



WO 03/038430 A1



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明細書

スクリーニング方法

技術分野

- 5 本発明は、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害作用を有し、消化管粘膜、特に胃粘膜細胞におけるネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物(消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物) またはその塩のスクリーニング方法、COX阻害作用を有し、かつ消化管粘膜、特に胃粘膜細胞のネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法等
- 10 に関する。

背景技術

- 現在において、最も主要な胃潰瘍、胃炎の原因として、非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)の使用が挙げられる。しかしながらその一方で、高齢化社会の進展に伴い、
- 15 NSAIDsを必要とする患者は今後も増え続けることが予想される。従ってNSAIDsによる胃粘膜障害の分子機構を解明し、胃粘膜障害副作用のないNSAIDsを開発することは大変重要であると考えられる。

- これまでNSAIDsによる胃粘膜障害は、NSAIDsがCOXを阻害し胃粘膜防御因子であるプロスタグランジンを減少させることが原因であるとされてきた。また炎症には
- 20 COX-2が主に発現し、胃粘膜ではCOX-1が主に発現していることからCOX-2選択的NSAIDsが胃粘膜障害のないNSAIDsになると考えられ、最近COX-2選択的NSAIDsが相次いで発売された。確かに選択性のないNSAIDsに比べ、COX-2選択的NSAIDsの胃粘膜障害は少なく、このアイデア(いわゆるCOXセオリー)は部分的には正しいと考えられる。しかし、(1)生体内で、COXを阻害する濃度と胃粘膜障害を起こす濃度には乖離が
- 25 ある、(2)COX-2選択的NSAIDsでも胃粘膜障害が見られる、(3)COX-2選択性と胃粘膜障害の間には、完全な相関性が見られない、等から、COX阻害に加えて、それ以外のNSAIDsによる胃粘膜障害の分子機構が存在すると考えられている。

本発明は、消化管粘膜障害副作用のないCOX阻害剤の開発を目的とする。

発明の開示

本発明者らは、NSAIDsによる胃粘膜障害における、COX阻害による間接作用と、ネクローシス・アポトーシス誘導による直接作用の位置づけを調べるために種々検討した結果、

(1) NSAIDsによるネクローシス・アポトーシスは、プロスタグランジンを添加しても影響を受けないこと（ネクローシス、アポトーシスの原因が、COX阻害でないこと、即ち直接作用と間接作用は独立したものであることを示している）、

(2) COX-2選択的NSAIDsでも、*in vitro*においてネクローシス、アポトーシスは起こり、その濃度は選択性のないNSAIDsと大差がないこと、

(3) 選択性のないNSAIDsでも、*in vivo*での胃粘膜障害の程度には大きな差が見られるが、その胃粘膜障害（*in vivo*）と*in vitro*でのNSAIDsのネクローシス・アポトーシス誘導能との間には相関性があること、

以上の点から、NSAIDsによる胃粘膜障害は、COX-1阻害によるプロスタグランジン低下を原因とする間接作用と、ネクローシス、アポトーシス誘導による直接作用（胃粘膜細胞直接障害）の両者が関与していることを見出し、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

〔1〕 COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法（本発明のスクリーニング方法(A)）；

〔2〕 COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物のスクリーニング方法；

〔3〕 消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である前記〔1〕または〔2〕記載のスクリーニング方法；

〔4〕 COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である前記〔1〕または〔2〕記載のスク

リーニング方法；

〔5〕前記〔1〕ないし〔4〕記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物またはその塩；

5 〔6〕前記〔5〕記載の化合物またはその塩を含有してなるCOX阻害剤；

〔7〕疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である前記〔6〕記載の剤；

〔8〕COX阻害作用を有する化合物およびネクローシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクローシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび／または

10 アポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法（本発明のスクリーニング方法(B)）；

〔9〕消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である前記〔8〕記載のスクリーニング方法；

〔10〕COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である前記〔8〕記載のスクリーニング方法；

15 〔11〕前記〔8〕ないし〔10〕記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩；

〔12〕前記〔11〕記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物；

20 〔13〕ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害剤である前記〔12〕記載の医薬組成物；

〔14〕疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である前記〔12〕記載の医薬組成物；

〔15〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を0.5～2時間培養しネクローシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクローシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法；

25 〔16〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を8～48時間培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法；

〔17〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しネクローシス誘

導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す IC_{50} 値が約 $100\mu M$ 以下であり、かつネクロシス誘導作用を示す ED_{50} 値が約 $100\mu M$ 以上である化合物のスクリーニング方法；

- 〔18〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す IC_{50} 値が約 $100\mu M$ 以下であり、かつアポトーシス誘導作用を示す ED_{50} 値が約 $100\mu M$ 以上である化合物のスクリーニング方法等を提供するものである。

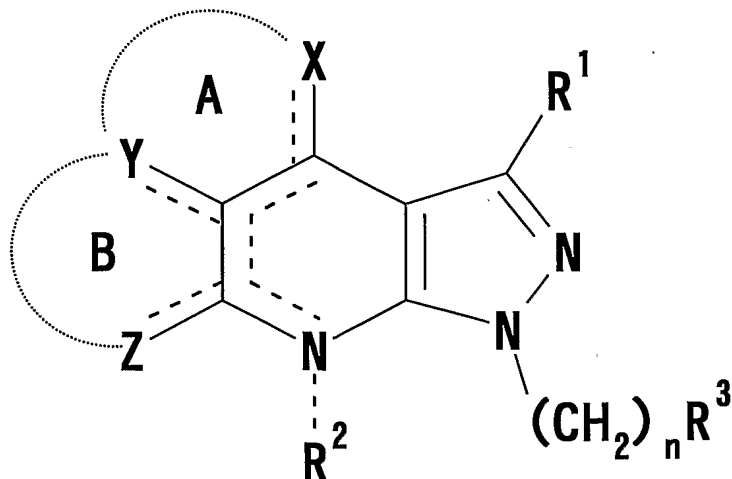
本発明における「COX阻害作用を有する化合物」としては、COX阻害作用を有する限りいかなる化合物をも用いることができる。

- 10 化合物としては、合成化合物、発酵生産物、遺伝子産物（ペプチドまたはタンパク質）等何れであってもよい。

COXとしては、COX-1、COX-2が挙げられる。

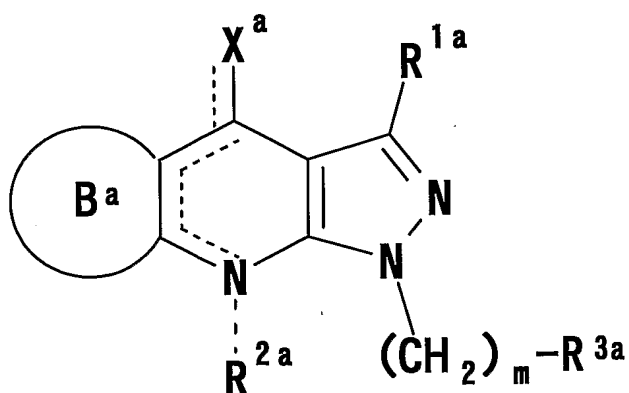
「COX阻害作用を有する」とは、通常COX作用に関する50%阻害濃度（ IC_{50} ）（COX作用を50%抑制するために必要な濃度）が約 $100\mu M$ 以下である化合物をいう。

- 15 具体的には、「COX阻害作用を有する化合物」としては、例えば、ジクロフェナック、インドメタシン、アスピリン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ピロキシカム等のクラシカルNSAIDs、セレコキシブ、ロフェコキシブ、MK-663、バルデコキシブ、SC-57666、JTE-522、S-2474、SC-57666等のCOX-2選択的阻害薬、ML-3000、p54（COX inhibitor & 5-lipoxygenase inhibitor）等のデュアルインヒビター、一酸化窒素遊
- 20 離型NSAIDs、およびW001/72749号公報記載の式(I)



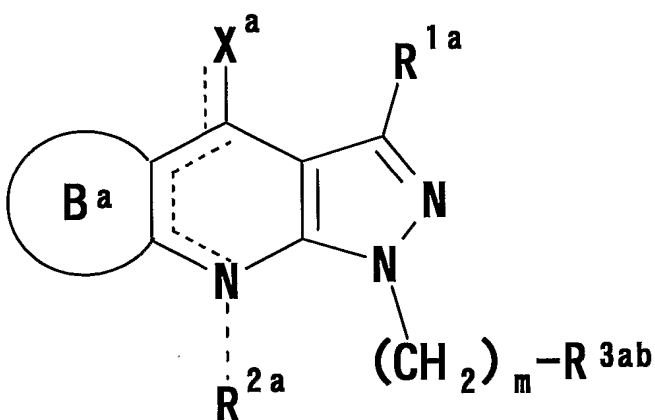
- [式中、 R^1 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい硫黄原子またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 R^2 は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 R^3 は置換基を有していてもよい複素環基、 X 、 Y および Z は、
- 5 各々、水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、置換基を有していてもよいアシル基、 $-NR^4R^5$ 、酸素原子、 $-OR^4$ 、硫黄原子または $-SR^4$ (R^4 および R^5 は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素
- 10 環基を形成してもよい) あるいは X と Y とが一緒になってA環を、または Y と Z とが一緒になってB環を形成してもよい、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、A環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、B環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 n は0または1の整数を示す] で表わされる化合物
- 15 またはその塩 (以下、化合物(I)と略記することがある) 等が挙げられる。

化合物(I)のなかでも、式(Ia)：



- [式中、 R^1a は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 R^2a は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 R^3a は置換基を有していてもよい複素環基、 X^a
- 20 は水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、置換基を有していてもよいアシル

基、 $-NR^{4a}R^{5a}$ 、酸素原子、 $-OR^{4a}$ 、硫黄原子または $-SR^{4a}$ (R^{4a} および R^{5a} は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい)、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、 B^a 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 m は0または1の整数を示す] で表わされる化合物またはその塩 (以下、化合物 (Ia) と略記することがある) 等が好ましく、とりわけ式 (Ia') :



[式中、 R^{1a} は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 R^{2a} は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 R^{3ab} は置換基を有していてもよい、ヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子とを含む不飽和単環式複素環基、 X^a は水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、置換基を有していてもよいアシル基、 $-NR^{4a}R^{5a}$ 、酸素原子、 $-OR^{4a}$ 、硫黄原子または $-SR^{4a}$ (R^{4a} および R^{5a} は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい)、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、 B^a 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 m は0または1の整数を示す] で表わされる化合物またはその塩 (以下、化合物 (Ia') と略記することが

10 15 20

ある)等が好ましい。

以下、化合物(I)について詳述する。

本明細書中で用いられる用語「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、例えば、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基および芳香族炭化水素基等があげられ、炭素数1ないし16個のものが好ましい。具体的には、例えば、

「アルキル基」は、例えば、低級アルキル基等が好ましく、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等の C_{1-6} アルキル基等が汎用される。

「アルケニル基」は、例えば、低級アルケニル基等が好ましく、例えば、ビニル、1-プロペニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル等の C_{2-6} アルケニル基等が汎用される。

「アルキニル基」は、例えば、低級アルキニル基等が好ましく、例えば、エチニル、プロパルギル、1-プロピニル等の C_{2-6} アルキニル基等が汎用される。

「シクロアルキル基」は、例えば、低級シクロアルキル基等が好ましく、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の C_{3-6} シクロアルキル基等が汎用される。

「アリール基」は、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、ビフェニル、2-インデニル、2-アンスリル等の C_{6-14} アリール基等が好ましく、例えば、フェニル基等が汎用される。

「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」が有していてもよい置換基としては、例えば、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等）、ニトロ基、シアノ基、ヒドロキシ基、ハロゲン化されていてもよい低級アルキル基（例えば、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-ブromoエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、3,3,3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、4,4,4-トリフルオロブチル、ペンチル、イソペンチル

- ル、ネオペンチル、5,5,5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6,6,6-トリフルオロヘキシル等のハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル基等)、低級アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、シクロプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、シクロブトキシ、ペンチルオキシ、シクロペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、シクロヘキシルオキシ等の C_{1-6} アルコキシ基等)、アミノ基、モノ-低級アルキルアミノ基(例えば、メチルアミノ、エチルアミノ等のモノ- C_{1-6} アルキルアミノ基等)、ジ-低級アルキルアミノ基(例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ等のジ- C_{1-6} アルキルアミノ基等)、カルボキシ基、低級アルキルカルボニル基(例えば、アセチル、プロピオニル等の C_{1-6} アルキルカルボニル基等)、低級アルコキシカルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル等の C_{1-6} アルコキシカルボニル基等)、カルバモイル基、モノ-低級アルキルカルバモイル基(例えば、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル等のモノ- C_{1-6} アルキルカルバモイル基等)、ジ-低級アルキルカルバモイル基(例えば、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル等のジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル基等)、アリールカルバモイル基(例えば、フェニルカルバモイル、ナフチルカルバモイル等の C_{6-10} アリールカルバモイル基等)、アリール基(例えば、フェニル、ナフチル等の C_{6-10} アリール基等)、アリールオキシ基(例えば、フェニルオキシ、ナフチルオキシ等の C_{6-10} アリールオキシ基等)、ハロゲン化されていてもよい低級アルキルカルボニルアミノ基(例えば、アセチルアミノ、トリフルオロアセチルアミノ等のハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ基等)等が用いられる。

該「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」は、前記の置換基を、炭化水素基の置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

- 本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれた1種または2種1ないし4個(好ましくは1ないし3個)のヘテロ原子を含む5ないし14員(好ましくは5ないし10員)の(単環式ないし3環式、好ましくは単環式または2環式)複素環基等があげられる。例えば、2-または3-チエニル、3-フリル、1-, 2-または3-

- ピロリル、1-、2-または3-ピロリジニル、2-、4-または5-オキサゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3-、4-または5-ピラゾリル、2-、3-または4-ピラゾリジニル、2-、4-または5-イミダゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5員環基、例えば、2-、3-または4-ピリジニル、N-オキシド-2-、3-または4-ピリジニル、2-、4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-、4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、ピペリジノ、2-、3-または4-ピペリジニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ピペラジニル、
- 5 トリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む6員環基、例えば、インドリル、ベンゾフリル、ベンズオキサゾリル、ベンズイミダゾリル、キノリニル、イソキノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、ジ
- 15 ベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む2環性または3環性縮合環基（好ましくは、前記の5または6員環が炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれるヘテロ原子を1ないし4個含んでいてもよい5または6員環基1または2個と縮合して形成される基）等が用いられる。中でも、炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれるヘテロ原子を1ないし3個含む5ないし7員（好ましくは5または6員）の複素環基が好ましい。
- 20

該「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」が有していてもよい置換基としては、例えば、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等）、低級アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等の C_{1-6} アルキル基等）、シクロアルキル基（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の C_{3-6} シクロアルキル基等）、低級アルキニル基（例えば、エチニル、1-ブ

25

- ロピニル、プロパルギル等の C_{2-6} アルキニル基等)、低級アルケニル基(例えば、ビニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル等の C_{2-6} アルケニル基等)、アラルキル基(例えば、ベンジル、 α -メチルベンジル、フェネチル等の C_{7-11} アラルキル基等)、アリール基(例えば、フェニル、ナフチル等の C_{6-10} アリール基等、好ましくはフェニル基)、低級アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ等の C_{1-6} アルコキシ基等)、アリールオキシ基(例えば、フェノキシ等の C_{6-10} アリールオキシ基等)、低級アルカノイル基(例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル等の C_{1-6} アルカノイル基等)、アリールカルボニル(例えば、ベンゾイル基、ナフトイル基等の C_{6-10} アリールカルボニル基等)、低級アルカノイルオキシ基(例えば、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ等の C_{1-6} アルカノイルオキシ基等)、アリールカルボニルオキシ基(例えば、ベンゾイルオキシ、ナフトイルオキシ等の C_{6-10} アリールカルボニルオキシ基等)、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル等の C_{1-6} アルコキシカルボニル基等)、アラルキルオキシカルボニル(例えば、ベンジルオキシカルボニル等の C_{7-11} アラルキルオキシカルボニル基等)、カルバモイル基、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-低級アルキル基(例えば、クロロメチル、ジクロロメチル、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル等のモノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ- C_{1-4} アルキル基等)、オキシ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-低級アルキルアミノ基(例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ等のモノ- C_{1-4} アルキルアミノ基等)、ジ-低級アルキルアミノ基(例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノ等のジ- C_{1-4} アルキルアミノ基等)、炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでいてもよい3ないし6員の環状アミノ基(例えば、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピロリニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イ

ミダゾリジニル、ピペリジル、モルホリニル、ジヒドロピリジニル、ピリジニル、N-メチルピペラジニル、N-エチルピペラジニル等の3ないし6員の環状アミノ基等)、アルキレンジオキシ基(例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等の C_{1-3} アルキレンジオキシ基等)、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、スルホ基、スルフィノ基、ホスホノ基、スルファモイル基、モノアルキルスルファモイル基(例えば、N-メチルスルファモイル、N-エチルスルファモイル、N-プロピルスルファモイル、N-イソプロピルスルファモイル、N-ブチルスルファモイル等のモノ- C_{1-6} アルキルスルファモイル基等)、ジアルキルスルファモイル基(例えば、N,N-ジメチルスルファモイル、N,N-ジエチルスルファモイル、N,N-ジプロピルスルファモイル、N,N-ジブチルスルファモイル等のジ- C_{1-6} アルキルスルファモイル基等)、アルキルチオ基(例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-ブチルチオ等の C_{1-6} アルキルチオ基等)、アリールチオ基(例えば、フェニルチオ、ナフチルチオ等の C_{6-10} アリールチオ基等)、低級アルキルスルフィニル基(例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、プロピルスルフィニル、イソプロピルスルフィニル、ブチルスルフィニル等の C_{1-6} アルキルスルフィニル基等)、アリールスルフィニル基(例えば、フェニルスルフィニル、ナフチルスルフィニル等の C_{6-10} アリールスルフィニル基等)、低級アルキルスルホニル基(例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル等の C_{1-6} アルキルスルホニル基等)、アリールスルホニル基(例えば、フェニルスルホニル、ナフチルスルホニル等の C_{6-10} アリールスルホニル基等)等が用いられる。

該「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」は、前記の置換基を、複素環基の置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合は、各置換基は同一または異なってもよい。

25 本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよいアミノ基」は、置換基として、例えば、前記「置換基を有していてもよい炭化水素基」等を1または2個有していてもよいアミノ基等があげられる。この「アミノ基」が有していてもよい置換基の好ましいものとしては、例えば、置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキル基、置換基を有し

ていてもよい C_{6-10} アリール基等である。該「 C_{1-6} アルキル基」、「 C_{6-10} アリール基」が有していてもよい置換基としては、前記「炭化水素基」が有していてもよい置換基と同様のものが用いられる。

5 本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよい低級アルキル基」の「低級アルキル基」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基等を示し、置換基として、例えば、前記「炭化水素基」が有していてもよい置換基等を1ないし3個有していてもよい。

10 本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよい低級アルコキシ基」の「低級アルコキシ基」は、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシおよびtert-ブトキシ等の C_{1-6} アルコキシ基等を示し、置換基として、例えば、前記「炭化水素基」が有していてもよい置換基等を1ないし3個有していてもよい。

15 本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよいベンゼン環」としては、例えば、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等）、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよいアミノ基、アミド基（例えば、アセトアミド等の C_{1-6} アシルアミノ基、好ましくは C_{1-6} アルカノイルアミノ基等）、置換基を有していてもよい低級アルコキシ基、低級アルキレンジオキシ基（例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等の C_{1-6} アルキレンジオキシ基等）、および前記の「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」が有していてもよい置換基と同様な基等から選ばれる同一または異なった1ないし3個（好ましくは1または2個）の置換基を置換可能な位置に有していてもよいベンゼン環を示す。

20

これらの「置換基を有していてもよい炭化水素基」、「置換基を有していてもよいアミノ基」および「置換基を有していてもよい低級アルコキシ基」としては、例えば、前記で詳細に説明したものと同様のものが用いられる。これらの「炭化水素基」、「アミノ基」および「低級アルコキシ基」が有する置換基の数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

25

該「置換基を有していてもよいベンゼン環」は、例えば、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素等）、 C_{1-6} アルキル基（例えば、メチル、エチル等）、およびモノ- C_{1-6}

アルキルアミノ基から選ばれた1ないし3個の置換基で置換されていてもよいベンゼン環等が好ましい。

本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよい硫黄原子」は、 $-SR^4$ で表される基を示す。ここで、 R^4 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置

5 換基を有していてもよい複素環基を示す。

本明細書中で用いる用語「エステル化されていてもよいカルボキシル基」は $-COOR^6$ で表わされる基を示す。ここに、 R^6 は水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基を示す。また、本明細書中で用いる用語「アミド化されていてもよいカルボキシル基」は $-CONR^7R^8$ で表わされる基を示す。ここで、 R^7 および R^8 は、各々、水素原子、

10 置換基を有していてもよい炭化水素基または両方が一緒になって、それらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい。

本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよいアシル基」は $-COR^9$ 、 $-SOR^9$ および $-SO_2R^9$ で表わされる基を示す。ここで R^9 は、前記した「置換基を有していてもよい炭化水素基」、「置換基を有していてもよい複素環基」を示す。

15 本明細書中で、 $-NR^4R^5$ において、「 R^4 と R^5 の両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に形成する環状アミノ基」および $-CONR^7R^8$ において、「 R^7 と R^8 の両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に形成する環状アミノ基」としては、例えば、炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでいてもよい3ないし6員の環状アミノ基（例えば、
20 アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピロリニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ジヒドロピリジニル、ピリジニル、N-メチルピペラジニル、N-エチルピペラジニル等の3ないし6員の環状アミノ基等）等を示す。

好ましくは、 R^3 の複素環基は含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ピリジン環である。その置換基としては、前記の「置換基を有していてもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 R^3 として、その含窒素複素環基とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成してもよい。

また、Xは水素原子、酸素原子、 $-OR^4$ （ここで、 R^4 は水素原子または置換基を有して

いてもよい炭化水素基) または置換基を有していてもよい炭化水素基が好ましい。

Yは水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、 $-\text{COR}^9$ または $-\text{COOR}^6$ が好ましく、 $-\text{COR}^9$ または $-\text{COOR}^6$ がより好ましい。Zは水素原子、酸素原子、 $-\text{OR}^4$ または置換基を有していてもよい炭化水素基(ここで、 R^4 は水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基)が好ましい。

A環またはB環で表される「置換基を有していてもよい5ないし7員の同素または複素環」の同素環としては、例えば、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタン、シクロペンテン、シクロペンタジエン、シクロヘキセン、シクロヘキサジエン、ベンゼン、シクロヘプテン、シクロヘプタンジエン等が挙げられ、なかでもベンゼン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタンが好ましく、とりわけベンゼンが好ましい。

A環またはB環で表される「置換基を有していてもよい5ないし7員の同素または複素環」の複素環としては、例えば、フラン、チオフェン、ピロール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、イミダゾール、ピラゾール、オキサジアゾール、フラザン、チアジアゾール、トリアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン等の芳香族複素環、アゼチジン、オキセタン、ピロリジン、ピペリジン、テトラヒドロピラン、モルホリン、チオモルホリン、ピペラジン等の非芳香族複素環、あるいは芳香族複素環の一部または全部の二重結合が飽和した非芳香族複素環等が挙げられる。

A環またはB環で表される「置換基を有していてもよい5ないし7員の同素または複素環」の置換基としては、前記の「置換基を有していてもよい複素環基」の置換基と同様の数、同様のものが挙げられる。

nは0が好ましい。

好ましくは、 R^{3a} の複素環基はヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子とを含む不飽和単環式複素環基、さらに好ましくは含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ピリジン環である。その置換基としては、前記の「置換基を有していてもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 R^{3a} として、その含窒素複素環基

とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成してもよい。 R^{3ab} のヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子とを含む不飽和単環式複素環基として、好ましくは含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ピリジン環が挙げられる。その置換基として、前記の「置換基を有していてもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 R^{3ab} として、その含窒素複素環基とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成してもよい。

また、 X^a は酸素原子または $-OR^{4a}$ (R^{4a} は水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基) が好ましく、B環およびB^a環としては置換基を有していてもよいベンゼン環が好ましく、特に、 R^{3a} または R^{3ab} が置換基を有していてもよい含窒素芳香複素環基でB^a環が置換基を有していてもよいベンゼン環の化合物(Ia)または(Ia') が好ましい。

m は0が好ましい。

化合物(I)、(Ia)または(Ia') の好ましい実施態様を以下に示す。

- 15 ・ R^2 が無置換または水素原子で、XとYとが一緒になってA環を形成していてもよい化合物(I)
- ・ R^3 が置換基を有していてもよい、ヘテロ原子として1個の窒素原子のみを含む不飽和複素環基で、 n が0である化合物(I)
- ・YおよびZがB環を形成し、B環が置換基を有していてもよい5ないし7員の同素または
- 20 複素環である化合物(I)
- ・ R^1 および R^2 の炭化水素基が、各々、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基または芳香族炭化水素基である化合物(I)
- ・ R^1 および R^2 の炭化水素基が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物(I)
- 25 ・A環またはB環の同素または複素環基が、単環式飽和炭化水素、ベンゼン環、ピリジン環またはチオフェン環である化合物(I)
- ・Xが水素原子、酸素原子、 $-OR^4$ (R^4 は前記と同意義を示す。) または置換基を有していてもよい炭化水素基である化合物(I)

- ・ Yが -COR^9 または -COOR^9 (R^9 および R^8 は前記と同意義を示す。) である化合物 (I)
 - ・ Zが水素原子、酸素原子、 -OR^4 (R^4 は前記と同意義を示す。) または置換されていてもよい炭化水素基である化合物 (I)
 - ・ R^{1a} および R^{2a} の炭化水素基が、各々、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基または芳香族炭化水素基である化合物 (Ia)
 - ・ R^{1a} および R^{2a} の炭化水素基が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物 (Ia)
 - ・ B^a 環の同素または複素環基が、単環式飽和炭化水素、ベンゼン環、ピリジン環またはチオフェン環である化合物 (Ia)
- 10
- ・ X^a が水素原子、酸素原子、 -OR^{4a} (R^{4a} は前記と同意義を示す。) または置換基を有していてもよい炭化水素基である化合物 (Ia)
 - ・ R^{1a} および R^{2a} が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物 (Ia')
 - ・ R^{3ab} が(1)ハロゲン原子、(2)低級アルキル基、(3)シクロアルキル基、(4)低級アル
- 15
- キニル基、(5)低級アルケニル基、(6)アラルキル基、(7)アリール基、(8)低級アルコキシ基、(9)アリールオキシ基、(10)低級アルカノイル基、(11)アリールカルボニル、(12)低級アルカノイルオキシ基、(13)アリールカルボニルオキシ基、(14)カルボキシ
- 20
- ル基、(15)低級アルコキシカルボニル基、(16)アラルキルオキシカルボニル基、(17)カルバモイル基、(18)モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-低級アルキル基、(19)アミジ
- 25
- ノ基、(20)アミノ基、(21)モノ-低級アルキルアミノ基、(22)ジ-低級アルキルアミノ基、(23)炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでいてもよい3ないし6員の環状アミノ基、(24)アルキレンジオキシ基、(25)ヒドロキシル基、(26)ニトロ基、(27)シアノ基、(28)メルカプト基、(29)スルホ基、(30)スルフィノ基、(31)ホスホノ基、(32)スルファモ
- 25
- イル基、(33)モノアルキルスルファモイル基、(34)ジアルキルスルファモイル基、(35)アルキルチオ基、(36)アリールチオ基、(37)低級アルキルスルフィニル基、(38)アリールスルフィニル基、(39)低級アルキルスルホニル基または(40)アリールスルホニル基で置換されていてもよいピリジニルである化合物 (Ia')

・ X^a が酸素原子または $-OR^{4a}$ (R^{4a} は水素原子または(1)ハロゲン原子、(2)ニトロ基、(3)シアノ基、(4)ヒドロキシル基、(5)ハロゲン化されていてもよい低級アルキル基、(6)低級アルコキシ基、(7)アミノ基、(8)モノ-低級アルキルアミノ基、(9)ジ-低級アルキルアミノ基、(10)カルボキシル基、(11)低級アルキル-カルボニル基、(12)低級アルコキシ-カルボニル基、(13)カルバモイル基、(14)モノ-低級アルキルカルバモイル基、(15)ジ-低級アルキルカルバモイル基、(16)アリールカルバモイル基、(17)アリール基、(18)アリールオキシ基または(19)ハロゲン化されていてもよい低級アルキルカルボニルアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基)である化合物(Ia')

・ R^{3ab} が含窒素芳香複素環基で、 B^a 環が(1)ハロゲン原子、(2)置換基を有していてもよい炭化水素基、(3)置換基を有していてもよいアミノ基、(4)置換基を有していてもよい低級アルコキシ基、(5)低級アルキレンジオキシ基、(6)アリールオキシ基、(7)低級アルカノイル基、(8)アリールカルボニル基、(9)低級アルカノイルオキシ基、(10)アリールカルボニルオキシ基、(11)カルボキシル基、(12)低級アルコキシカルボニル基、(13)アラルキルオキシカルボニル基、(14)カルバモイル基、(15)モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-低級アルキル基、(16)アミジノ基、(17)アミノ基、(18)モノ-低級アルキルアミノ基、(19)ジ-低級アルキルアミノ基、(20)炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでもよい3ないし6員の環状アミノ基、(21)アルキレンジオキシ基、(22)ヒドロキシル基、(23)ニトロ基、(24)シアノ基、(25)メルカプト基、(26)スルホ基、(27)スルフィノ基、(28)ホスホノ基、(29)スルファモイル基、(30)モノアルキルスルファモイル基、(31)ジアルキルスルファモイル基、(32)アルキルスルファニル基、(33)アリールスルファニル基、(34)低級アルキルスルフィニル基、(35)アリールスルフィニル基、(36)低級アルキルスルホニル基または(37)アリールスルホニル基で置換されていてもよいベンゼン環である化合物(Ia')

特に好ましい化合物(Ia)または(Ia')としては、例えば、6,7-ジフルオロ-3-メチル-1-(2-ピリニジル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、3-メチル-1-(2-ピリジニル)-6-トリフルオロメチル-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、6-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ

[3, 4-b]キノリン-4-オン、7-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン、3-エチル-6, 7-ジフルオロ-1-(2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン、6, 7-ジフルオロ-3-メチル-1-(3-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン、6, 7-ジフルオロ-3-メチル-1-(6-メチル-2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン、6, 7-ジフルオロ-3-メチル-1-(6-フェニル-2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン、5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オンおよび1-(2-ピリジニル)-1, 9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3, 4-b]キノリン-4-オン等が挙げられる。

10 化合物(I)、(Ia)および(Ia')の塩としては、例えば、薬理学的に許容される塩等が用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等が挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、
15 トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N-ジベンジルエチレンジアミン等との塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等との塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アス
20 パラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。

とりわけ、薬学的に許容可能な塩が好ましく、その例としては、化合物(I)、(Ia)および(Ia')内に塩基性官能基を有する場合には、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等無機酸との塩、例えば、酢酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、マレイ

ン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸との塩が挙げられ、酸性官能基を有する場合には、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられる。

- 5 化合物(I)、(Ia)および(Ia')は、例えばW001/72749号公報に記載の方法に従って製造することができる。

本発明で用いられる「COX阻害作用を有する化合物」としては、上記の例示に限られるものではなく、例えば、以下のスクリーニングにおいてCOX阻害作用を有すると認められる化合物も用いることができる。

10 (COX阻害作用のスクリーニング)

COX-1またはCOX-2を含有するミクロソーム画分、補因子(1 M Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、1.0 % Tween 20、50 mM ルミノール、100 mM hematin)を混合後、試験化合物を添加し、37℃で25分間静置する。アラキドン酸(20 mM)を添加することにより反応を開始させ、アラキドン酸添加直後から10秒間の化学発光量をルミスター(Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH))を用いて計測する。対照化合物として flurbiprofen (4 mM)を添加時の酵素活性を0 %、対照化合物および試験化合物を無添加時の酵素活性を100 % とし、酵素活性に関する50 % 阻害濃度(IC₅₀) (酵素活性を50 % 抑制するために必要な濃度) が約100 μM 以下である化合物を「COX阻害作用を有する化合物」とする。

- 20 また、COX阻害作用は、COX-2選択的阻害作用であるものがより好ましい。

本発明のスクリーニング方法(A)は、消化管粘膜細胞、特に胃粘膜細胞培養系を用いて、COX阻害作用を有する化合物の中からネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物を選択する方法である。

- 25 ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物とは、例えば、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導に関する50 % 有効濃度(ED₅₀) (50 % の細胞にネクロシスおよび／またはアポトーシスを誘導するために必要な濃度) が約100 μM以上である化合物をいう。

以下に本発明のスクリーニング方法(A)について詳述する。

胃粘膜細胞の調整法

モルモット（雄四週齢）から取り出した胃を切開し、洗浄後、胃粘膜細胞を剥離する。細胞は、アクチナーゼ、コレゲナーゼ処理後、コラーゲンコートしたシャーレで、0.3%牛血清存在下で12時間培養する。浮遊細胞を除去した後、以下のアポトーシス、

5 ネクロシスのアッセイに用いる。

1. COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法

膜の透過性変化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてネクロシスを誘導する条件を検討し、1時間NSAIDs処理で見られる細胞死がネクロシスであることが見出されている（Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 10 2001）。

検査対象のNSAIDsの0.5～2時間（好ましくは1時間）処理における細胞死を、トリパンプルー染色法（Dig. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000）、及びMTT法（Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001）で調べることにより、ネクロシスを検出することができる。

15 この検出方法で、試験化合物のネクロシス誘導に関する50%有効濃度（ED₅₀）（50%の細胞にネクロシスを誘導するために必要な濃度）を算出することができる。

試験化合物のネクロシス誘導作用を示すED₅₀値と、COX阻害作用を示すIC₅₀値とを比較し、（ネクロシス誘導作用を示すED₅₀値）を（COX阻害作用を示すIC₅₀値）で除した値が大きければ大きいほど「COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物」である。該「COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物」として好ましくは、COX阻害作用を示すIC₅₀値が約100 μM以下かつネクロシス誘導作用を示すED₅₀値が約100 μM以上である化合物であり、より好ましくは、COX阻害作用を示すIC₅₀値が約20 μM以下で、かつネクロシス誘導作用を示すED₅₀値が約100 μM以上である化合物である。

25 2. COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法

DNAの断片化、クロマチンの凝集、caspaseの活性化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する条件を検討し、16時間NSAIDs処理で見られる細胞死がアポトーシスであることが見出されている（Am. J. Physiol. Gastrointest.

Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。

検査対象のNSAIDsの8～48時間（好ましくは12～24時間、より好ましくは16時間）
処理における細胞死を、トリパンブルー染色法 (Dig. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、
及びMTT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で調べることにより、アポト
5 ーシスを検出することができる。

この検出方法で、試験化合物のアポトーシス誘導に関する50%有効濃度 (ED_{50})
(50%の細胞にアポトーシスを誘導するために必要な濃度) を算出することができる。
試験化合物のアポトーシス誘導作用を示す ED_{50} 値と、COX阻害作用を示す IC_{50} 値とを比
較し、（アポトーシス誘導作用を示す ED_{50} 値）を（COX阻害作用を示す IC_{50} 値）で除し
10 た値が大きければ大きいほど「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化
合物」である。該「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物」とし
て好ましくは、COX阻害作用を示す IC_{50} 値が約100 μ M以下かつアポトーシス誘導作用
を示す ED_{50} 値が約100 μ M以上である化合物であり、より好ましくは、COX阻害作用を
示す IC_{50} 値が約20 μ M以下で、かつアポトーシス誘導作用を示す ED_{50} 値が約100 μ M以上
15 である化合物である。

また、上記のスクリーニング方法(A)に代えて、ネクローシスおよび／またはアポ
トーシス誘導作用の弱い化合物を選択した後、当該ネクローシスおよび／またはアポ
トーシス誘導作用の弱い化合物の存在下にCOX阻害作用を検出することによっても、
「COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化
20 合物」を選択することができる。

また、上記のスクリーニング方法(A)において、ネクローシスおよび／またはアポ
トーシス誘導作用を有する化合物と試験化合物とを共存させることにより、ネクロー
シスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物をスクリーニングす
ることができる。

すなわち、本発明のスクリーニング方法(B)は、ネクローシスおよび／またはアポ
トーシス誘導作用を有する化合物の存在下に、消化管粘膜細胞、特に胃粘膜細胞培養
系を用いて、COX阻害作用を有する化合物の中からネクローシスおよび／またはアポ
トーシス誘導阻害作用を有する化合物を選択する方法である。

ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を示す化合物とは、通常、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度(IC_{50}) (誘導されたネクロシスおよび／またはアポトーシスを50%抑制するために必要な濃度) が約100 μ M以下である化合物をいう。

- 5 ここで用いられるネクロシス誘導作用を有する化合物としては、例えばインドメタシン、アスピリン、ジクロフェナック等が挙げられ、なかでもインドメタシン等が好ましく用いられる。また、アポトーシス誘導作用を有する化合物としては、インドメタシン、アスピリン、ジクロフェナック等が挙げられ、なかでもインドメタシン等が好ましく用いられる。
- 10 以下にCOX阻害作用およびネクロシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法、COX阻害作用およびアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法について詳述する。

3. COX阻害作用およびネクロシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法

- 15 膜の透過性変化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてネクロシスを誘導する条件を検討し、1時間NSAIDs処理で見られる細胞死がネクロシスであることが見出されている (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。

- 20 検査対象のNSAIDsの0.5～2時間 (好ましくは1時間) 処理における細胞死を、トリパンプルー染色法 (Dig. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で調べることにより、ネクロシスを検出することができる。

- 25 この0.5～2時間 (好ましくは1時間) NSAIDs処理胃粘膜細胞においてネクロシスを誘導する評価系に試験化合物を共存させることにより、試験化合物のネクロシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度(IC_{50}) (誘導されたネクロシスを50%抑制するために必要な濃度) を算出することができる。ネクロシス誘導阻害作用を示す化合物としては、好ましくはその IC_{50} 値が約100 μ M以下である化合物であり、より好ましくは、その IC_{50} 値が約20 μ M以下である化合物である。

4. COX阻害作用およびアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法

DNAの断片化、クロマチンの凝集、caspaseの活性化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する条件を検討し、16時間NSAIDs処理で見られる細胞死がアポトーシスであることが見出されている (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。

検査対象のNSAIDsの8～48時間（好ましくは12～24時間、より好ましくは16時間）処理における細胞死を、トリパンブルー染色法 (Dig. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で調べることにより、アポトーシスを検出することができる。

この8～24時間（好ましくは12～24時間、より好ましくは16時間）NSAIDs処理胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する評価系に試験化合物を共存させることにより、試験化合物のアポトーシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度 (IC_{50})（誘導されたアポトーシスを50%抑制するために必要な濃度）を算出することができる。アポトーシス誘導阻害作用を示す化合物としては、好ましくはその IC_{50} 値が約100 μM 以下である化合物であり、より好ましくは、その IC_{50} 値が約20 μM 以下である化合物である。

また、上記のスクリーニング方法(B)に代えて、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物を選択した後、当該ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物の存在下にCOX阻害作用を検出することによっても、「COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物」を選択することができる。

上記のスクリーニング方法で得られる化合物は、塩を形成していてもよく、かかる塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩等が用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等があげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩等があげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等との塩等があげられる。

- 5 無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸等との塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸等との塩があげられる。

- 10 塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニン等との塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸等との塩があげられる。

- 本発明のスクリーニング方法(A)で得られる(1)COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られる(2)COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、消化管粘膜障害、特に胃粘膜障害の副作用のない優れたNSAIDsとして有用であり、ヒトおよび動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウマ、ウシ、サル等）において安全に用いることができる。
- 15

- 20 本発明のスクリーニング方法(A)で得られるCOX阻害作用を有し、ネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られるCOX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、例えば、疼痛（例えば、癌性疼痛、炎症による急性痛、慢性炎症による痛み、術後痛（切開創の痛み、深部痛、内臓痛、術後慢性痛等）、筋肉痛（慢性痛疾患に伴う筋肉痛、肩こり等）、関節痛、歯痛、顎関節痛、頭痛（偏頭痛、緊張型頭痛、発熱に伴う頭痛、高血圧に伴う頭痛等）、内臓痛（心臓痛、狭心痛、腹痛、腎臓の痛み、尿管の痛み、膀胱の痛み等）、産婦人科領域の痛み（中間痛、月経困難、陣痛等）、神経痛（椎間板ヘルニア、神経根痛、帯状疱疹後神経痛、三叉神
- 25

経痛等)等)、炎症性疾患(疼痛発熱、網膜症、腎症、神経障害、大血管障害等の糖尿病性合併症、リウマチ、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、リウマチ様脊髄炎、痛風性関節炎、骨膜炎等の関節炎、腰痛、痛風、手術・外傷後の炎症、腫脹の緩解、神経痛、咽頭炎、膀胱炎、慢性肝炎、急性膵炎、慢性膵炎、クローン病、潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患、髄膜炎、炎症性眼疾患、肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核等の炎症性肺疾患等)、アレルギー性疾患(喘息、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患等)、中枢神経障害(脳出血および脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊椎損傷、脳浮腫、多発性硬化症等)、神経変性疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、エイズ脳症等)、全身性エリセマトーデス、乾癬、膀胱ガン、乳ガン、子宮頸部ガン、慢性リンパ性白血球、慢性骨髄性白血病、大腸ガン、結腸ガン、直腸ガン、ヘリコバクターピロリ感染症、ホジキン病、インスリン依存性糖尿病、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非ホジキン性リンパ腫、非小細胞肺ガン、卵巣ガン、消化性潰瘍、前立腺ガン、不妊症、ベーチェット病、全身性真菌感染症、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、バクテリア肺炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染症、AIDS、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ、侵襲性ブドウ状球菌感染症、敗血症、間質性肝疾患、時局性回腸炎、循環器系疾患(狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、汎発性血管内凝固症候群、動脈硬化、末梢血管疾患等)等の予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法(A)で得られる(1)COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られる(2)COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、COX阻害活性による各種の疾患の予防、治療において、自体公知の方法により薬理学的に許容される担体を混合した医薬組成物として安全に投与することができる。該投与量は、投与対象、投与ルート、疾患等によっても異なるが、例えば成人に対し、経口剤として投与する場合、約0.1ないし20 mg/kg体重、好ましくは約0.2ないし10 mg/kg体重、さらに好ましくは約0.5ないし10 mg/kg体重であって、1日1ないし数回に分けて投与することができる。

本発明の医薬組成物の製造に用いられてもよい薬理学的に許容される担体として

は、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質があげられ、例えば、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等があげられる。また、必要に応じて、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を用いることもできる。

賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

10 結合剤としては、例えば、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

溶剤としては、例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

20 溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤；例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。

等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリ

セリン、D-マンニトール等が挙げられる。

緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール等が挙げられる。

- 5 防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

- 10 また、本発明の医薬組成物は、糖尿病治療剤、糖尿病性合併症治療剤、抗高脂血症剤、降圧剤、利尿剤、化学療法剤、免疫療法剤などの薬剤（以下、併用薬剤と略記する）と組み合わせて用いることができる。また、本発明の医薬組成物自体がこれら併用薬剤を含有することもできる。本明細書においては、特に断りがない限り、単に「併用」
- 15 する形態のいずれであってもよい。別々の薬剤として組み合わせて使用する際、本発明の剤および併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。さらに、併用薬剤は、2種以上を適宜の割合で組み合わせて用いてもよい。

- 併用薬剤の投与量は、各薬剤の臨床上用いられている用量を基準として適宜選択
- 20 することができる。また、本発明の剤と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせなどにより適宜選択することができる。

以下に参考例、製造例、実験例および実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

- 25 以下の製造例中の「室温」は、通常、約10℃から約35℃を示す。％は特記しない限り重量パーセントを示す。シリカゲルは特記しない限りKieselgel 60、0.063～0.200mm(Merck)を示し、塩基性シリカゲルと記載されている場合はChromatorex NH-DM1020、0.100～0.200mm、（富士シリシア化学）を示す。

以下の実験例に記載の遺伝子操作法は、マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (ColdSpring Harbor Laboratory、1989年) に記載されている方法もしくは試薬の添付プロトコールに記載されている方法に従った。

その他の本文中で用いられている略号は下記の意味を示す。

- 5 s : シングレット (singlet)
- d : ダブルレット (doublet)
- t : トリプレット (triplet)
- q : クアルテット (quartet)
- m : マルチプレット (multiplet)
- 10 br : ブロード (broad)
- J : カップリング定数 (coupling constant)
- Hz : ヘルツ (Hertz)
- CDCl₃ : 重クロロホルム
- DMSO-d₆ : 重ジメチルスルホキシド
- 15 NMR : プロトン核磁気共鳴

実施例

製造例 1 2-ヒドラジノピリジン

ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.)、28巻、1394
20 頁(1985年)に記載の方法に準じて製造した。2-クロロピリジン(200 mL、2.1 mol)およびヒドラジン一水和物(400 mL、8.2 mol)を20時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、過剰の抱水ヒドラジンを減圧下で濃縮留去して、残渣を水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を
25 留去して、表題化合物(収量157 g、収率68%)を得た。本品はこれ以上精製することなく次の工程に用いた。

製造例 2 3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン

アミノクロトノニトリル(82 g、1.0 mol)および2-ヒドラジノピリジン(120 g、1.1

mol)のエタノール(300 mL)氷冷溶液に、酢酸(132 g, 2.2 mol)を加えて3.5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去し、残渣に水を加えた。さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)で精製することにより、表題化合物(収量156.3 g、収率90%)を得た。融点103-104℃(酢酸エチルから再結晶)。

NMR(CDCl₃) δ: 2.25 (3H, s), 5.37 (1H, s), 5.92 (2H, br s), 7.07 (1H, m), 7.76 (1H, m), 7.94 (1H, d, J = 7.0 Hz), 8.32 (1H, d, J = 6.0 Hz)。

10 製造例3 2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)安息香酸

テトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Lett.)、37巻、2767頁(1996年)に記載の方法に準じて製造した。アルゴン雰囲気下、1-クロロ-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン(25.8 g, 143 mmol)およびテトラメチルエチレンジアミン(16.6 g, 143 mmol)のテトラヒドロフラン(250 mL)溶液を-78℃まで冷却し、そこに1.6モルブチルリチウムヘキサン(89.4 mL, 143 mmol)溶液を滴下し、同温で30分間攪拌した。反応液を砕いたドライアイスに注意深く注ぎ、室温まで昇温した。溶媒を減圧下で濃縮した後、残渣を水に注いだ。これをジエチルエーテルで洗浄した後、濃塩酸を加えて酸性にし、有機物をジクロロメタンで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を濃縮留去した。得られた残渣をヘキサンから結晶化して、表題化合物(収率20.6 g、収率64%)を得た。

NMR(CDCl₃) δ: 7.65 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.75 (1H, dd, J = 2.2 Hz, 8.4 Hz), 8.31 (1H, d, J = 2.2 Hz), hidden(1H)。

製造例4 2-[[3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル]アミノ]-5-(トリフルオロメチル)安息香酸

25 アルゴン雰囲気下、3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン(8.71 g, 50.0 mmol)、2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)安息香酸(12.4 g, 55.0 mmol)、酢酸銅(II)(1.00 g, 5.50 mmol)および炭酸カリウム(7.60 g, 55.0 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50 mL)溶液を1.5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反

応混合物を水に注いだ。酢酸溶液で弱酸性にした後、析出した粗結晶を濾取した。これを水で洗浄後風乾して、表題化合物（収量17.7 g、収率89%）を得た。

融点228-229℃（酢酸エチルから再結晶）。

5 NMR(CDC1₃) δ: 2.37 (3H, s), 6.19 (1H, s), 7.13 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.70-7.85 (3H, m), 7.93 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.39 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.45 (1H, ddd, J = 0.8 Hz, 1.8 Hz, 4.8 Hz), 12.46 (1H, br s), hidden (1H)。

元素分析値: C₁₇H₁₃F₃N₄O₂として

計算値: C, 56.36; H, 3.62; N, 15.46。

実測値: C, 56.56; H, 3.52; N, 15.63。

10 製造例 5 4-クロロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン

2-[[3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル]アミノ]-5-(トリフルオロメチル)安息香酸(14.0 g, 38.6 mmol)のオキシ塩化リン(27.4 mL, 294 mmol)溶液を1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去して、残渣を氷水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて中和した後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：クロロホルム=1：1～クロロホルム）で精製して、表題化合物（収量7.07 g、収率50%）を得た。

20 融点206℃（酢酸エチル／メタノールから再結晶）。

NMR(CDC1₃) δ: 3.01 (3H, s), 7.28 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.91-7.99 (2H, m), 8.27 (1H, d, J = 9.2 Hz), 8.68-8.77 (3H, m)。

元素分析値: C₁₇H₁₀ClF₃N₄として

計算値: C, 56.29; H, 2.78; N, 15.45; Cl, 9.77; F, 15.71。

25 実測値: C, 56.23; H, 3.00; N, 15.23; Cl, 9.62; F, 15.70。

製造例 6 3-メチル-1-(2-ピリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン（以下、化合物Aと略記する）

4-クロロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ

[3, 4-b]キノリン(6.50 g, 17.9 mmol)のエタノール(300 mL)溶液に、6規定塩酸(10 mL, 60 mmol)を加えて5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、析出した結晶を濾取した。これをエタノールで洗浄後風乾し、得られた結晶をエタノールから再結晶して、表題化合物(収量4.69 g、収率76%)を得た。

5 融点250-251°C (エタノールから再結晶)。

NMR(CDCl₃) δ : 2.74 (3H, s), 7.26 (1H, ddd, J = 1.2 Hz, 5.0 Hz, 7.2 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, J = 2.0 Hz, 8.8 Hz), 7.92 (1H, ddd, J = 1.8 Hz, 7.2 Hz, 8.4 Hz), 8.03 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.2 Hz, 8.4 Hz), 8.49 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.8 Hz, 5.0 Hz), 8.75 (1H, d, J = 2.0 Hz), 11.65 (1H, br s)。

10 元素分析値: C₁₇H₁₁F₃N₄Oとして

計算値: C, 59.31; H, 3.22; N, 16.27; F, 16.55。

実測値: C, 59.23; H, 3.40; N, 16.00; F, 16.59。

製造例7 1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン
(以下、化合物Bと略記する)

15 メタンスルホン酸(20 mL, 0.31 mol)に五酸化二リン(5.00 g, 35.2 mmol)を加えて100°Cに加熱した。同温でこの反応混合物を良く攪拌しながら、2-[1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル] アミノ] 安息香酸(1.94 g, 6.92 mmol)の粉末を少量ずつ加えた。反応混合物を同温度下で10分間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷却後、反応混合物に氷水を加えた。さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール = 99:1)で精製して、表題化合物(収量1.35 g、収率74%)を得た。

20 融点240-242°C (エタノールから再結晶)。

25 NMR(DMSO-d₆) δ 7.32-7.40 (1H, m), 7.42-7.49 (1H, m), 7.71-7.80 (1H, m), 7.96-8.01 (1H, m), 8.07-8.15 (2H, m), 8.24-8.29 (1H, m), 8.39 (1H, s), 8.64-8.68 (1H, m), 12.03 (1H, br s)。

元素分析値: C₁₅H₁₀N₄Oとして

計算値：C, 68.69; H, 3.84; N, 21.36。

実測値：C, 68.68; H, 3.89; N, 21.36。

製造例 8 4-クロロ-5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン

- 5 アルゴン雰囲気下、3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン (5.23 g, 30 mmol)、2-フルオロ-6-ヨード安息香酸 (9.57 g, 36 mmol)、酢酸銅(II) (0.654 g, 3.6 mmol) および炭酸カリウム (4.98 g, 36 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド (30mL) 溶液を1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応混合物を水に注いだ。酢酸溶液で弱酸性にした後、析出した粗結晶を濾取し、水で洗浄後風乾した。
- 10 得られた粗結晶をオキシ塩化リン (20 mL, 0.21 mol) に溶解し、1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去して、残渣を氷水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、
- 15 表題化合物 (収量4.78 g、収率51%) を得た。

融点160-161℃ (酢酸エチルから再結晶)。

NMR(CDCl₃) δ: 3.01 (3H, s), 7.14-7.29 (2H, m), 7.63-7.76 (1H, m), 7.88-8.01 (2H, m), 8.65-8.78 (2H, m)。

元素分析値：C₁₆H₁₀ClFN₄として

- 20 計算値：C, 61.45; H, 3.22; N, 17.92; Cl, 11.34; F, 6.08。

実測値：C, 61.19; H, 3.43; N, 17.94; Cl, 11.23; F, 6.05。

製造例 9 5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン 塩酸塩 (以下、化合物Cと略記する)

- 4-クロロ-5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン
- 25 (4.78 g, 15 mmol) のエタノール (60 mL) 溶液に、6規定塩酸 (6.25 mL, 38 mmol) を加えて2時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去した。残渣に水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾

燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した後に塩酸塩に変換して、表題化合物(収量4.04 g、収率80%)を得た。

融点 $>380^{\circ}\text{C}$

5 NMR(DMSO- d_6) δ : 2.58 (3H, s), 6.42–6.54 (1H, m), 7.09–7.29 (3H, m), 7.84–7.95 (1H, m), 8.44 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, 4.8 Hz), 8.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), hidden (1H)。

元素分析値: $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}\cdot\text{HCl}$ として

計算値: C, 58.10; H, 3.66; N, 16.94; F, 5.74。

実測値: C, 58.44; H, 3.32; N, 16.83; F, 5.75。

10 参考例1 ヒトCOX-1cDNA組換えバキュロウイルスの調製

PCR法で取得したヒトCOX-1cDNA (FASEB J., 5 (9), 2304–2312 (1991)) を含む1.8 kbのDNA断片をプラスミドpFASTBAC1 (CIBCOBRL)に挿入し、プラスミドpFBCOX1を作製した。

15 プラスミドpFBCOX1とBAC-T0-BAC Baculovirus Expression System (GIBCOBRL)を用いて組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX1を調製した。

参考例2 COX-1発現昆虫細胞からのミクロソーム画分の調製

20 Sf-21細胞を 1×10^6 cells/mlとなるように125 ml Sf-900 II SFM培地(GIBCO-BRL)に播種した後、 27°C で24時間培養した。組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX1を0.75 ml添加した後、さらに72時間培養した。培養液から遠心分離(3000 rpm、10分間)により、細胞を分離した後、PBSで細胞を2回洗浄した。細胞を10 ml Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA)に懸濁した後、ホモジナイザー(POLYTRON)で20000 rpm、20秒間処理を3回行うことで細胞を破碎した。遠心分離(2000 rpm、10分間)して得られた上清を遠心分離(40000 rpm、45分間)して得た沈殿をLysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA)に再懸濁して、 -80°C で保存した。

25 参考例3 ヒトCOX-2cDNA組換えバキュロウイルスの調製

PCR法で取得したヒトCOX-2cDNA (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89 (16), 7384–7388 (1992)) を含む1.8 kbのDNA断片をプラスミドpFASTBAC1 (CIBCOBRL)に挿

入し、プラスミドpFBCOX2を作製した。

プラスミドpFBCOX2とBAC-T0-BAC Baculovirus Expression System (GIBCOBRL)を用いて組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX2を調製した。

参考例4 COX-2発現昆虫細胞からのミクロソーム画分の調製

- 5 Sf-21細胞を 1×10^6 cells/mlとなるように125 ml Sf-900 II SFM培地(GIBCOBRL)に播種した後、27℃で24時間培養した。組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX2を0.75 ml添加した後、さらに72時間培養した。培養液から遠心分離(3000 rpm、10分間)により、細胞を分離した後、PBSで細胞を2回洗浄した。細胞を10 ml Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA)に懸濁した後、ホモジナイザ
- 10 ー(POLYTRON)で20000 rpm、20秒間処理を3回行うことで細胞を破碎した。遠心分離(2000 rpm、10分間)して得られた上清を遠心分離(40000 rpm、45分間)して得た沈殿をLysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA)に再懸濁して、-80℃で保存した。

試験例1 COX-1、COX-2阻害活性の測定

- 15 10倍濃度の反応バッファー(1M Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、1.0 % Tween20、50 mM ルミノール、100 μ M hematin) 20 μ lとミクロソーム画分(COX-1: 40 μ g、COX-2: 20 μ g) 20 μ lと蒸留水55 μ lを混合後、DMFに溶解した供試化合物を5 μ l添加し、37℃で25分間静置した。アラキドン酸(20 μ M)を100 μ l添加する事により反応を開始させ、アラキドン酸添加直後から10秒間の化学発光量をルミスター
- 20 (Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH))を用いて計測した。阻害率はDMF 5 μ l添加時の酵素活性を100%、flurbiprofen (4 mM) 5 μ l添加時の酵素活性を0%として計算した。

酵素活性を50%阻害するのに必要な供試化合物の濃度(IC₅₀値)をPRISM2.01(グラフパッドソフトウェア社)にて算出した。結果を表1に示す。

〔表 1〕

検体	COX-1阻害活性 (IC ₅₀ 値)	COX-2阻害活性 (IC ₅₀ 値)
化合物A	0.45 μ M	0.38 μ M
化合物B	2.66 μ M	1.37 μ M
化合物C	7.80 μ M	3.70 μ M

表 1 の結果から、化合物A, BおよびCは、優れたCOX阻害作用を有することが分かる。

実施例 1 ネクローシス検出方法

- 5 試験化合物をモルモット胃粘膜初代培養細胞と、1時間処理 (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001) したのち、細胞の生存率を、トリパンブルー染色法 (Dig. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、あるいはMTT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で調べることにより、ネクローシスを検出することができる。また、ネクローシスが起きていることの確認は以下の方法で
- 10 核膜の損傷を調べることによって行うことができる。

(核膜損傷のアッセイ)

細胞を 0.17 mM Hoechst 33342 と100 μ g/ml propidium iodideで 20 分インキュベートした後、蛍光顕微鏡で観察する。ネクローシスを起こした細胞は、propidium iodide を排出できないため、ピンク色に核が染まる。

- 15 上記の方法によりネクローシスを検出することにより試験化合物のED₅₀を算出し、該化合物のCOX阻害作用についてのIC₅₀と比較することにより「COX阻害作用を有し、ネクローシス誘導作用の弱い化合物」を得ることができる。

実施例 2 アポトーシス検出方法

- 20 化合物Bまたは化合物Cをモルモット胃粘膜初代培養細胞と、16時間処理 (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001) したのち、MTT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で細胞生存率を測定することより、アポトーシスを検出した。結果を表 2 に示す。

〔表 2〕

化合物濃度	生存率 (%)	
	平均値 (n = 3) ± 標準誤差	
	化合物B	化合物C
0 mM	100 ± 3.5	100 ± 3.1
0.1 mM	—	102 ± 2.4
0.2 mM	100 ± 3.9	100 ± 5.1
0.3 mM	102 ± 1.9	106 ± 1.3
0.4 mM	100 ± 0.4	100 ± 0.6
0.5 mM	96 ± 4.9	99 ± 2.4
0.6 mM	99 ± 4.7	—
0.7 mM	99 ± 2.9	—

また、アポトーシスが起きていることの確認は以下の方法でDNA断片化を検出することによっても行うことができる。

(DNA断片化)

- 5 細胞を70 μ lのlysis buffer (50 mM Tris-HCl, (pH7.8), 10 mM EDTA, 0.5% sodium-*N*-lauroylsarcosinate)で懸濁後、Proteinase Kを最終濃度1 mg/mlで50℃、2時間インキュベートする。次にRNaseAを最終濃度0.5 mg/mlで50℃、30分インキュベートする。サンプルは2% agarose gel electrophoresis で解析する。

- 上記の方法によりアポトーシスを検出することにより試験化合物のED₅₀を算出し、
 10 該化合物のCOX阻害作用についてのIC₅₀と比較することにより「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物」を得ることができる。

実施例3 化合物Aのコート錠の製造

- | | |
|------------------|--------|
| (1) 化合物A | 10.0 g |
| (2) 乳糖 | 60.0 g |
| 15 (3) コーンスターチ | 35.0 g |
| (4) ゼラチン | 3.0 g |
| (5) ステアリン酸マグネシウム | 2.0 g |

- 化合物A 10.0 gと乳糖60.0 gおよびコーンスターチ35.0 gの混合物を10重量%ゼラチン水溶液30 ml（ゼラチンとして3.0 g）を用い、1 mmメッシュの篩を通して顆粒化し、40℃で乾燥し、再び篩過する。得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム2.0 gと混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸濁液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出して1000錠のコート錠を得る。

実施例4 化合物Aの錠剤の製造

- | | | |
|----|------------------|--------|
| | (1) 化合物A | 10.0 g |
| | (2) 乳糖 | 70.0 g |
| 10 | (3) コーンスターチ | 50.0 g |
| | (4) 可溶性デンプン | 7.0 g |
| | (5) ステアリン酸マグネシウム | 3.0 g |

- 化合物A 10.0 gとステアリン酸マグネシウム3.0 gを可溶性デンプンの水溶液70 ml（可溶性デンプンとして7.0 g）で顆粒化し、乾燥し、乳糖70.0 gおよびコーンスターチ50.0 gと混合する。混合物を圧縮して1000錠の錠剤を得る。

実施例5 化合物Bのコート錠の製造

- | | | |
|----|------------------|--------|
| | (1) 化合物B | 10.0 g |
| | (2) 乳糖 | 60.0 g |
| | (3) コーンスターチ | 35.0 g |
| 20 | (4) ゼラチン | 3.0 g |
| | (5) ステアリン酸マグネシウム | 2.0 g |

- 化合物B 10.0 gと乳糖60.0 gおよびコーンスターチ35.0 gの混合物を10重量%ゼラチン水溶液30 ml（ゼラチンとして3.0 g）を用い、1 mmメッシュの篩を通して顆粒化し、40℃で乾燥し、再び篩過する。得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム2.0 gと混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸濁液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出して1000錠のコート錠を得る。

実施例6 化合物Bの錠剤の製造

- | | |
|--------------------|--------|
| (1) 化合物B | 10.0 g |
| (2) 乳糖 | 70.0 g |
| (3) コーンスターチ | 50.0 g |
| (4) 可溶性デンプン | 7.0 g |
| 5 (5) ステアリン酸マグネシウム | 3.0 g |

化合物B 10.0 gとステアリン酸マグネシウム3.0 gを可溶性デンプンの水溶液70 ml（可溶性デンプンとして7.0 g）で顆粒化し、乾燥し、乳糖70.0 gおよびコーンスターチ50.0 gと混合する。混合物を圧縮して1000錠の錠剤を得る。

10

産業上の利用可能性

本発明のスクリーニング方法により、(1) COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および(2) COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物を効率良く得ることができる。

15

本発明のスクリーニング方法で得られる(1) COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および(2) COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、消化管粘膜障害、特に胃粘膜障害のない非ステロイド性抗炎症剤等として有用である。

請求の範囲

1. COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。
- 5
2. COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物のスクリーニング方法。
3. 消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である請求項 1 または 2 記載のスクリーニング方法。
- 10
4. COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である請求項 1 または 2 記載のスクリーニング方法。
5. 請求項 1 ないし 4 記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物またはその塩。
6. 請求項 5 記載の化合物またはその塩を含有してなるCOX阻害剤。
- 15
7. 疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である請求項 6 記載の剤。
8. COX阻害作用を有する化合物およびネクロシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法。
- 20
9. 消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である請求項 8 記載のスクリーニング方法。
10. COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である請求項 8 記載のスクリーニング方法。
11. 請求項 8 ないし 10 記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩。
- 25
12. 請求項 11 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物。
13. ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害剤である請求項 12 記載の医薬組成物。
14. 疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である請求項 12 記載の医薬組成物。

15. COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を0.5～2時間培養しネクローシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクローシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。

5 16. COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を8～48時間培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。

10 17. COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しネクローシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す IC_{50} 値が約100 μM 以下であり、かつネクローシス誘導作用を示す ED_{50} 値が約100 μM 以上である化合物のスクリーニング方法。

18. COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す IC_{50} 値が約100 μM 以下であり、かつアポトーシス誘導作用を示す ED_{50} 値が約100 μM 以上である化合物のスクリーニング方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P29/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P29/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-94823 A (Cell Pathway, Inc.), 09 April, 1999 (09.04.99), & US 5858694 A & NO 982477 A & EP 881300 A & EP 1038523 A & IL 124699 A & ES 2132055 A & DE 69800488 A & AT 198771 A	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 January, 2003 (28.01.03)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P29/00, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P29/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-94823 A (セル パスウェイズ インコーポレ イテッド) 1999. 04. 09 & US 5858694 A & NO 982477 A & EP 881300 A & EP 1038523 A & IL 124699 A & ES 2132055 A & DE 69800488 A & AT 198771 A	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 01. 03

国際調査報告の発送日

12.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典



2 J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3251